

近年中国色谱研究进展[#]张祥民¹, 张丽华², 张玉奎^{2*}

(1. 复旦大学化学系, 上海 200433; 2. 中国科学院分离分析化学重点实验室, 国家色谱研究分析中心, 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要: 20 世纪末至今, 是中国色谱学科全面快速发展的重要时期。伴随着生命科学、材料科学、能源科学、环境科学等学科不断发展, 特别是功能基因组学、蛋白质组学、代谢组学和糖组学等组学研究的兴起, 色谱学科得到了更加密切的关注和更加广泛的运用, 我国色谱工作者也在上述方面取得了显著的成绩, 一些研究成果在国际上具有一定的影响力。本文对近年来我国色谱工作者在色谱基础理论、分离分析方法与技术、新型色谱柱和富集材料、新型色谱分析仪器设备以及相关开发与应用等方面的一些典型工作进行介绍。

关键词: 中国色谱; 研究进展; 典型工作; 综述

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012) 03-0222-10

Recent advances of chromatographic research in China

ZHANG Xiangmin¹, ZHANG Lihua², ZHANG Yukui^{2*}

(1. Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China;

2. CAS Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, National Chromatographic R. & A. Center, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: Since the end of 20th century, chromatographic science has experienced a rapid development in China. Along with the current developments of life science, material science, energy science and environmental science, especially the rise of researches in functional genomics, proteomics, metabolomics, glycomics etc, chromatography has got more close attention and extensive applications. During this period, the chromatography researchers of China have made significant achievements, published a considerable number of papers in the world-class academic journals and made some impacts on the international research. This review summarizes some of the representative studies of chromatographic research in China about the basic theories of chromatography, new separation and analytical methods and techniques, new columns and enrichment materials, new equipments and applications of chromatographic analysis in the last decade.

Key words: chromatographic science in China; research development; representative works; review

色谱技术的出现及发展至今已将近 110 年。在此期间, 色谱理论全面快速发展, 色谱技术积累了大量的应用方法, 得到了极其广泛的运用。从自然科学的划分上看, 色谱归属于分析化学中的一个分支, 但其影响力和应用范围已经远远超出了分析化学本身的范畴。无论是自然科学的基础研究, 还是国民经济的发展建设, 色谱技术都在其中发挥着越来越重要的作用。目前, 人们对复杂体系的高分辨、高选

择、高精度、高灵敏和高通量的分离分析提出了更高的要求。在这种情况下, 色谱作为一种强大的分离分析手段, 始终为推动生物医学和人类健康、环境监测与保护、国家安全等领域的发展提供着解决问题的关键技术。随着生命科学、环境科学、药学等学科研究的新领域不断涌现和深入发展, 色谱技术在生物制药、蛋白质组学、生物分子的分离分析方面都发挥着越来越重要的作用。

* 通讯联系人: 张玉奎, 中国科学院院士, 研究员, 博士生导师, 主要从事色谱基本理论和新技术、新方法的研究。E-mail: ykzhang@dicp.ac.cn.

基金项目: 国家自然科学基金委创新群体项目(21021004)。

收稿日期: 2011-12-29

[#] 此篇文章系《色谱》编辑部根据张玉奎院士在 2011 年 10 月召开的第 2 届大连国际色谱学术报告会上所做的大会报告《中国色谱研究进展》编写, 由雷小元博士执笔。

1 中国色谱发展概况

在我国,色谱学科也经历了从无到有、从初步创立到广泛应用的发展历程。尤其是在20世纪末至今,在我国色谱工作者的共同努力下,中国色谱学科在色谱基础理论、分离分析方法与技术、新型色谱柱和富集材料、新型色谱分析仪器设备以及相关开发与应用等方面取得了诸多有价值的研究成果,在国际上的整体影响力亦愈发明显。

Web of Science 数据库和中国科技期刊数据库“中国期刊全文数据库”和“万方数据库”的检索数据(2011年9月25日检索)表明,1990年至2010年我国科技工作者在美国科学情报研究所科学引文索引收录期刊(即SCI期刊)和中国科技期刊上发表色谱相关论文132 604篇(其中SCI期刊论文27 381篇,中国科技期刊数据库论文105 223篇),数量逐年递增(见图1)。其中涉及毛细管电泳(CE)、气相色谱(GC)和高效液相色谱(HPLC)方法的论文数量的增长态势见图2。以论文中色谱方法所涉及的领域来考察,以SCI扩展版(SCI-EXPAND-ED)、社会科学引文索引(SSCI)、艺术与人文科学引文索引(A & HCI)、科学技术会议录引文索引(CP-CI-S)和社科及人文会议录引文索引(CPCI-SSH)为统计源,色谱方法应用于化学领域的论文数量占46%,生物化学与分子生物学领域的占21%,食品科学与技术领域的占5%,材料科学、工程学、微生物学领域的各占4%,环境科学、光谱学和药理学领域的各占3%,上述领域之外的论文比例为8%。1990年至2010年,中国科学家所发表的色谱领域论文总数以28 062篇的数量居世界第三位(第一名:美国,71 008篇;第二名:日本,35 035篇)。2010年发表论文4 146篇,2011年发表4 574篇,排名跃居世界第一。这些数据反映了色谱方法和技术的研究与应用在我国的迅猛发展。

2 色谱基础理论研究

色谱理论研究是色谱方法发展的重要基础和来源。我国色谱工作者基于前人的理论,结合实际工作,将研究的重点放在色谱保留方程以及模型的建立、新型固定相的保留机理研究、物理化学常数和酶反应动力学常数计算等方面。这些研究结果对不同类型色谱固定相保留行为的研究以及对新型固定相和色谱柱的制备具有一定的指导意义。

在色谱理论计算方面,反相高效液相色谱(RP-HPLC)的保留因子通常被认为由保留过程中的分子

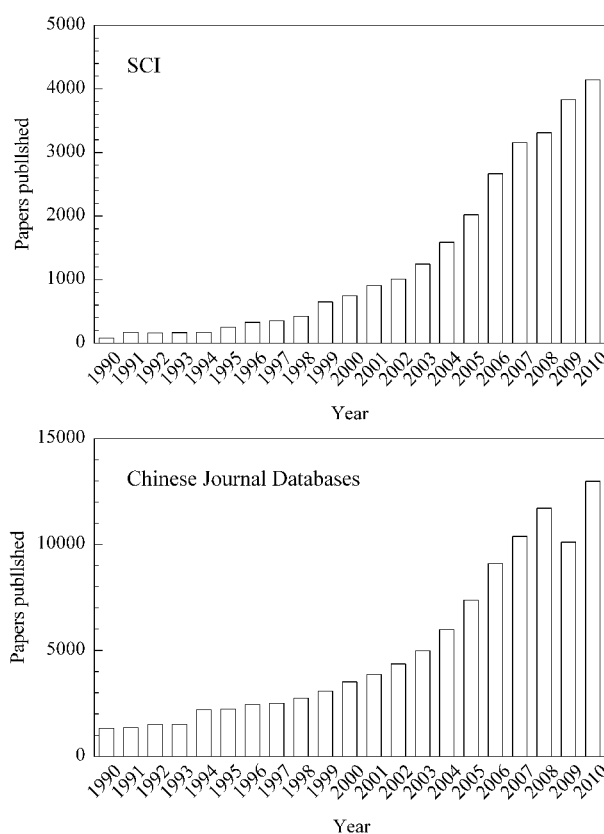


图1 中国科技工作者在1990-2010年发表的色谱论文数量

Fig. 1 Chinese scientists published papers on chromatography (1990-2010)

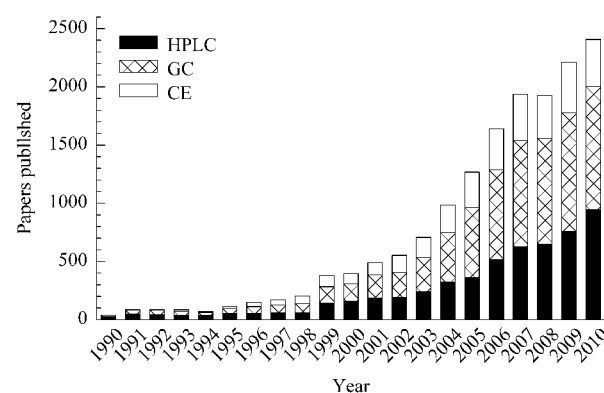


图2 涉及毛细管电泳、气相色谱和高效液相色谱方法的论文数量的增长态势

Fig. 2 The growth trend for published papers on chromatography in CE, GC and HPLC research

间相互作用决定,可以视为线性自由能关系(LFERs)的化学分子描述符^[1]。梁鑫淼等^[2]在比较了十八烷基键合硅胶(ODS)、氰基键合硅胶(CN)和苯基键合硅胶(Ph)三者的线性溶剂自由能关系(LSERs)后,建立了一个用ODS柱、CN柱及Ph柱上的RP-HPLC保留因子作为变量来评价土壤吸附因子的新的线性自由能模型;将该模型用于预测化合物的保留值时准确性较高。他们采用一系列不同

类型的参照化合物进行检验后发现,多柱法比单柱法更能有效地评价土壤吸附系数;实验中将标准土壤装填成液相色谱柱,所得到的化合物保留值与模型预测值一致,从而反映了该模型在色谱固定相研究和制备中的实用价值。

张祥民等^[3]采用偏微分方程研究了制备色谱理论中单组分的理想分离模型,建立了以 Langmuir 等温吸附为基础的制备色谱梯度流出曲线理论模型;将此非线性等温线用于计算一阶线性、多阶线性和多台阶梯度时的流出曲线形状,获得了与有限差分法(finite difference method)非常一致的计算结果。与制备色谱领域普遍采用的有限差分法理论模型相比,所建立的新的理想模型方法简便、准确性高,在制备色谱预测与应用中具有重要意义。

耿信笃等^[4]用计量置换理论(stoichiometric displacement theory, SDT)与蛋白质分子定向(orientation of protein molecule, OPM)相结合,提出了在混合模式色谱(mixed-mode chromatography, MMC)中蛋白质等生物大分子的 OPM-SDT 保留机理。只用 SDT 一种理论就合理地解释了生物大分子在 MMC 中“U-型洗脱曲线”的形成机理,又用 SDT 中的第一组线性参数斜率 Z 和截距 $\log I$ 作图,呈线性则表明溶质与固定相的相互作用力为非选择性作用力[反相高效液相色谱(RPLC)和疏水作用色谱(HIC)便属于此],否则便为选择性作用力,从而定量描述了“U-型洗脱曲线”的一半为选择性作用力的离子交换色谱(IEC)机理,另一半为非选择性作用力的 HIC 机理。依此还对 α -糜蛋白酶在脲浓度变化条件下究竟是天然态变性体,还是蛋白折叠的中间态进行了辨别^[5]。此法可用于蛋白质组学研究中对抗形态的功能蛋白质和非功能蛋白质的识别。

蒋生祥等^[6]研究了离子液体(IL)用于 RP-HPLC 固定相的保留机理。他们制备了溴代 1-烯丙基-3-丁基咪唑离子液体[AyBIm]Br,并以表面自由基链转移反应对 3-巯丙基硅胶进行了功能化修饰,得到了 IL 修饰的硅胶固定相,并用 HPLC 法对包括多种位置异构体的多环芳烃(PAHs)化合物在新制备的 IL 固定相上的选择性保留行为做了研究。结果表明在 IL 固定相分离 PAHs 和偶极化合物的过程中,电子相互作用、离子-偶极作用占主导地位,疏水作用占次要地位。这一结果预示着 IL 应用于硅胶固定相的巨大潜力。

杨更亮等^[7]建立了应用亲和色谱(AC)柱测定酶反应动力学参数的新方法。他们将人血清白蛋白

(HSA)固定于聚甲基丙烯酸环氧丙酯/二甲基丙烯酸乙二醇酯[poly(GMA-EDMA)]亚微米整体柱填料表面,将所制备的 AC 柱成功地用于氨基酸的手性分离,测定了 D 型氨基酸氧化酶催化反应的动力学参数。将该方法应用于 D-色氨酸的定量分析中,线性范围为 12.0 ~ 979.0 $\mu\text{mol/L}$,相关系数在 0.99 以上。此外,将该固定相用于尿样分析,结果表明其分析流程更加快捷。该固定相可以用来研究 D 型氨基酸氧化酶的催化活性及手性转换反应中酶的作用机制。

3 分析新技术与新方法

3.1 蛋白质组学分析中的多维色谱/整合平台

人类基因组测序计划完成后,蛋白质组学研究被提上了日程。近年来, HPLC 和 CE 为蛋白质组学和多肽的分离分析提供了新的手段。然而一维分离所能提供的分辨率和峰容量往往十分有限,为了对复杂蛋白质样品进行更有效的分离分析,色谱工作者常将 CE 和 LC 等分离手段联用以提高分辨率。与一维分离模式相比,多种分离手段组合运用的多维分离技术拥有更大的峰容量。在蛋白质组学分析中的多维色谱/分析平台构建方面,近年来我国色谱工作者分别构建了强阳离子交换-18 通道-反相高效液相色谱-基质辅助激光解吸串联飞行时间质谱(2D SCX-18-array-RPLC-MALDI-MS/MS)二维分析系统、体积排阻色谱-强阳离子交换-反相高效液相色谱-串联质谱(3D SEC-SCX-RPLC-MS/MS)三维分析系统、反相高效液相色谱-反相高效液相色谱-电喷雾串联质谱(2D RPLC-RPLC-ESI-MS/MS)二维分析系统、固定化酶反应器-强阳离子交换-微柱反相液相色谱-电喷雾串联质谱(IMER-2D-SCX- μ RPLC-ESI-MS/MS)二维分析系统等多种分析平台。这些平台的构建为多种复杂蛋白质样品的分离和鉴定能力的大幅提高做出了有益的尝试。

张祥民等^[8]将高通量毛细管阵列-2D RPLC 系统与 MALDI-串联飞行时间质谱(TOF-TOF MS)相结合进行全面的蛋白质组学分析。其中 SCX 柱用来做第一维的分离,18 通道的 RP-HPLC 柱用来做第二维的分析,可快速完成进样、浓缩除盐、分离及鉴定,实现蛋白质组学研究所需要的真正的高通量分析。其阵列式的并行接口使系统在第二维 18 根反相柱上实现并行洗脱,样品分析时间缩短为原有方法的 1/18。系统中 SCX 柱采用阶梯式盐梯度洗脱,洗脱下来的组分通过 2 个十通阀的切换后,被依次保留在 18 个自制预富集柱的柱头进行样品的浓

缩和除盐,然后经多通道式接口被并行反冲到相应的 RP-HPLC 柱上,在 18 根 RP-HPLC 柱上同时完成色谱分离。色谱流出物通过一个自行设计加工的接口并行点样到 MALDI 靶板上,最后联用 MALDI-TOF-TOF MS 进行快速鉴定。整个系统在 3 h 内对 300 μg 人肝蛋白酶解肽段样本进行分离鉴定,共鉴定出 500 个蛋白质,证明该系统在蛋白质高通量分析中的应用潜力。

目前,乌枪法和 SCX-RPLC-MS/MS 体系在蛋白质组研究中广泛使用,但并不适合于对哺乳动物组织样本或细胞等复杂蛋白质体系的分析。为了提高蛋白质鉴定的可信度和数量,采用在线多维技术对样品组分进行预分离很有必要。张祥民等^[9]将 SEC 用于样品和流动相的选择性分离,建立了 3D SEC-SCX-RPLC-MS/MS 系统,使系统理论峰容量达到 1×10^5 。相对于二维色谱,鉴定得到 1 688 个非冗余蛋白质,不仅所鉴定的蛋白质数量提高了 2.5 倍,而且 2 个以上肽匹配的蛋白质数量占 65% (常规方法约为 40%),证明该分析平台是蛋白质分离鉴定的有效方法。

蛋白质磷酸化作用在真核细胞中调节一系列重要的生物过程,然而由于蛋白质样品的复杂性,导致实际发现的磷酸化位点数目远低于实际存在的数目。邹汉法等^[10]建立了一种新的双反相二维色谱平台用于磷酸化肽的高效率二维分离。在这个方法中,采取碱性 pH 条件与酸性 pH 条件组合、前后组分混合的策略以提高正交性。实验中大量的碎片肽段在碱性 pH 环境中的第一维 RP-HPLC 上获得分离,在相同的时间内,将每 2 个流分按照洗脱的前后顺序收集在一起。最后,收集的流分用 RPLC-MS/MS 在酸性 pH 环境中进行分析,获得人肝脏磷酸化蛋白质 8 000 个,比应用传统的 RP-HPLC 方法得到的鉴定结果提高了 30%。该研究为磷酸化肽以及球蛋白的高效分离鉴定提供了有效的方法。

张丽华等^[11]建立了针对膜蛋白质组分析的 IMER-SCX- μ RPLC-ESI-MS/MS 平台。实验中首先用甲酸将膜蛋白样品溶解,再经胃蛋白酶 IMER 酶解后,用二维离子交换色谱和微柱反相色谱-质谱联用系统进行肽段的分离鉴定。利用该平台,可从鼠肝微粒体提取物中鉴定到 235 个蛋白质,其中 39% 的鉴定结果为包含一个或一个以上跨膜区域的膜蛋白质。该平台为实现膜蛋白质组的在线样品预处理和分离鉴定提供了有力的工具。

张丽华等^[12]还建立了一个集成化糖蛋白组样品处理平台,可以在线同时实现包括糖肽富集、缓冲

液置换和去糖基化的糖肽预处理过程,进而显著提高对 *N*-连接糖肽的糖基化位点鉴定的灵敏度和效率。该系统在 50 倍过量牛血清白蛋白(BSA)存在条件下鉴定出亲和素中的糖肽,检出限可达到 5 fmol。此外,样品预处理时间可缩短在 1 h 之内。该系统被成功地用于鼠脑中提取的可溶性蛋白质的分析。在 6 μg 的进样量条件下,采用纳流液相色谱-电喷雾串联质谱(nanoLC-ESI-MS/MS)共鉴定出 120 个糖蛋白和 196 个 *N*-连接糖基化位点,显著提高了 *N*-连接糖蛋白组学的分析通量。

阎超等^[13]将梯度加压毛细管电色谱(pCEC)与具有完全正交分离机理的毛细管等电聚焦(cIEF)联用。cIEF 为第一维,反相 pCEC 为第二维,以隔离于电场之外的微型六通阀作为接口,搭建了 cIEF 与 pCEC 在线二维联用平台,并应用在 BSA 酶解肽段和人血红细胞裂解液(HRBCL)的蛋白质及其胰蛋白酶裂解液的分析分离中。以 BSA 的胰蛋白酶解肽段对该二维平台进行评价,共检测到大约 300 个肽段,理论峰容量平均约为 30 000。结果证明 cIEF 的聚焦能力和 pCEC 的双重分离机制使该二维系统在分离复杂生物样品中具有独特优势,为复杂生物样品的分离提供了一种新颖有效的分离工具。

3.2 代谢组学分析

代谢组学是继基因组学和蛋白质组学之后发展起来的一种研究生物系统的组学方法,目的在于通过分析生物体液及组织中所有小分子物质以观察有机体内物质代谢状况,进而研究生物体系的内源性代谢物质种类、数量及其变化规律,探索生物整体、系统或器官的内源性代谢物质及其与内在或外在因素的相互作用。代谢组学是新药研究开发的重要组成部分。我国色谱工作者将色谱方法与技术强大的分离鉴定能力运用于代谢组学,为研究药物体内代谢、作用机理和阐释中医药复杂理论体系提供了很好的技术平台。

为了考察生物体因外界刺激而导致的代谢状态的变化,需对代谢物中尽可能多的代谢物进行(半)定量分析。通过构建新型流路,许国旺等^[14]实现了 RP-HPLC 和亲水作用色谱(HILIC)的在线联用分析,从而解决了采用一维液相色谱(无论是 RP-HPLC 还是 HILIC)-质谱联用技术只能获得其中一类代谢产物的信息以及在死时间流出的色谱峰通常被排除在后续数据分析过程之外,造成分析方法导致的代谢物信息丢失的问题。他们用该系统研究了人参皂甙 Rg3 对肿瘤大鼠的作用,52 min 内在第一个 HILIC 柱上分离得到 5 686 个代谢物碎片,在第

二个 RP-HPLC 柱上得到另外 1 808 个碎片。发现在单一高剂量的 Rg3 喂养条件下癌症大鼠的代谢模式发生了明显的变化,17 个在 RP-HPLC 柱上没有保留的潜在标志物得到确认。他们^[15]进一步研究发现,通过优化两维间的流动相组成,HILIC 柱之间也能实现适中的正交性,并据此建立了 HILIC × HILIC-MSⁿ 多维液相色谱分离体系;将其成功地应用于一种天然产物提取物皂树皂甙的组分研究中,鉴定出 46 种单体组分,其中 8 种此前未见报道,证明这一体系对亲水性复杂样品多维分离的适用性。

李发美等^[16]发展了研究药物干预下 II 型糖尿病患者血清中代谢物变化的新方法。他们采集了 20 例 II 型糖尿病患者和 15 例经盐酸二甲双胍治疗 3 个月患者的血清样品,研究了经盐酸二甲双胍治疗后 II 型糖尿病患者血清的生化变化,运用核磁共振氢谱(1H NMR)和超高效液相色谱(UPLC)-MS 技术生成了代谢指纹图谱并用该图谱进行了代谢组学分析。1H NMR 结果显示,与未经治疗的患者相比,经过治疗的患者血清中的甲胺-N-氧化物(TMAO)、3-羟基丁酸酯(3-HB)增加,而葡萄糖、N-乙酰糖蛋白(NAC)、脂蛋白、乳酸、乙酰乙酸浓度和不饱和脂类含量降低。阳离子电离模式下的 UPLC-MS 检测发现,治疗组患者血清中色氨酸浓度增加,苯丙氨酸和溶血磷脂酰胆碱(C16:0LPC, C18:0LPC, C18:2LPC)浓度下降。该研究表明 UPLC-MS 联合 1H NMR 的分析方法能全面检测 II 型糖尿病治疗组患者血清中的生化变化,可以为研究盐酸二甲双胍治疗糖尿病的机制提供帮助。

3.3 微流控芯片与微流控分析

以微流控芯片为代表的芯片实验室分析技术已取得了长足的发展,这主要得益于 CE 技术在芯片上的成功应用,其高速与高效的分离能力展示了芯片系统的巨大应用价值。与 CE 相比,色谱受分离微通道表面性质的影响较小、重现性好、分辨率高,具有更好的稳定性和重现性,现已成为常规芯片分析中应用广泛的分离技术。基于微流控芯片的色谱系统具有消耗少、分析快、效率高的优点,且易于实现色谱系统的集成化、微型化和自动化,因此具有广阔的应用前景。近年来我国色谱工作者在保证实验可靠性和重现性的前提下,在提高芯片操控的简便性、简化芯片复杂度的同时提高实验通量、发展更加有效的芯片观察手段、实现芯片上成熟分析手段的高效移植与联用等方面取得一系列的成绩与进展。

方群等^[17]基于前期建立的纳升级取样探针-缺口管阵列试样引入系统,利用实验中观察到的自发

进样中的液滴分裂现象,建立了在毛细管内实现皮升级(<100 pL)试样引入的微流控平移自发进样方法。该方法被应用于基于短毛细管的高速 CE 系统,在有效分离长度为 5 cm 的毛细管上,实现了 8 种荧光标记氨基酸的高速分离,分离时间仅为 21 s,同时获得高分离效率(最高达 5 000 000 塔板/m)。他们^[18]将芯片采样探针和多个通道整合,开发了液滴微流控筛选系统用于样品导入、试剂融合和纳升级液滴生成,实现了芯片液滴系统对不同试样的超高通量引入(最高达 6 000 个试样/h)。他们^[19]还研发了自动化进行纳升至皮升级液滴生成和分析筛选的微流控操作系统——液滴实验室(DropLab)。DropLab 可实现对每个液滴的体积和化学组成的精确控制,并可在液滴内进行微量化学反应、分析和筛选。该系统被应用于高通量、低消耗的酶抑制分析和蛋白质结晶条件筛选。采用 50 种不同的沉淀剂进行溶菌酶结晶条件的筛选,每个筛选液滴内蛋白质和沉淀剂的体积仅为 6 nL,试样、试剂消耗量仅为常规方法的 1/10 000 ~ 1/1 000。

刘震等^[20-21]研发了性能优良的聚二甲基硅氧烷(PDMS)芯片用于毛细管等电聚焦全柱成像检测技术(CIEF-WCID)。与商业化的毛细管比较,该芯片具有相当的性能,但具有无透镜效应、可调节的宽高比和低成本等优势^[20]。随后的实验中将商业化的透析膜整合入系统以分离电解质和样品,减少了不必要的压力流,同时系统采用经过表面预处理的熔融石英毛细管作进样通道,压力流的消除使整合了透析膜的微流控芯片显著提高了等电聚焦(IEF)分析的重复性,并且进样比第一代芯片更加简便^[21]。在这个研究中,2 个 PDMS 芯片的微通道规格分别为 100 μm(长) × 100 μm(宽)和 200 μm(长) × 50 μm(宽)。将它们应用于蛋白质的定量与定性分析,采用 CIEF-WCID 成功分离了混合样品中包括 6 个不同 pI(pH 范围为 3 ~ 10)的蛋白质标记物,pI 值和峰位置的关系使 pH 梯度显示了良好的线性,两个芯片的相关系数分别是 0.999 4 和 0.999 5。同时应用该系统也分离了更复杂的含有 HbA、HbF、HbS 和 HbC 4 个变种的人血红蛋白样品,在 20 ~ 100 mg/L 范围内 IEF 峰面积和血红蛋白浓度的线性关系良好,显示了 CIEF-WCID 系统的良好分离性能。

林金明等^[22]建立了集成芯片-在线固相萃取(SPE)-在线电喷雾四极杆飞行时间质谱(ESI-Q-TOF MS)分析方法用于分析药物代谢产物。微流控装置分别与 2 个独立的微通道相连,SPE 微流控芯

片被划分为细胞培养、代谢物生成、样品 SPE 和 MS 检测几个单元用来进行药物代谢研究。为了验证采用微流控芯片研究药物代谢的可行性,实验中对人肺上皮细胞 A549 中维生素 E 的代谢过程进行了研究。实验结果表明,在线 ESI-Q-TOF MS 检测到了相关代谢产物;该系统分析灵敏度高,所用时间短,通过整合几个平行的通道,脱盐和浓缩过程可以同时完成,整个样品预处理时间只需要 15 min,溶剂使用量小于 100 μL 。因此,所开发的 SPE 微流控芯片是一种研究细胞药物代谢的有效工具。

4 新型色谱柱与富集材料

4.1 新型固定相

作为目前广泛运用的分析方法之一,色谱技术在环境、生化、药物等领域的应用日益普遍。其中色谱固定相可谓是色谱技术的核心,它不仅是色谱方法建立的基础,而且也是一种重要的消耗品,因此新型色谱固定相的研究与开发一直是人们的研究课题。我国色谱工作者在新型色谱固定相材料的选择和制备,如 IL 型色谱固定相、分子印迹法合成硅胶杂化整体柱、碳纳米管固定相、核壳复合材料固定相,以及寡糖 AC 和免疫亲和色谱(IAC)固定相等方面均做出了有价值的尝试,为手性及生物样品的分析分离与制备分离奠定了基础。

IL 气相色谱固定相是近年来颇具吸引力的一个研究方向,其优势是用作固定相时表现出独特的“双重性质”(dual nature),而且合成方法的灵活性为 IL 固定相的修饰提供了广阔的空间。邢钧等^[23]合成了离子液体键合聚硅氧烷([PSOMIM][NTf₂]),将聚硅氧烷的良好涂渍性能与 IL 的分离选择性相结合,较好地解决了 IL 在涂渍性能及热稳定性等方面存在的问题。实验结果表明,[PSOMIM][NTf₂]固定相保持了 IL 的作用力特征,柱效为 4 776 塔板/m ($K=3.64 \pm 0.08$, 萘),最高使用温度为 300 $^{\circ}\text{C}$,平均极性为 561。该固定相对弱极性和极性芳香异构体、芳香胺类、脂肪酸类化合物及多氯联苯(PCBs)等均显示了良好的选择性。

邹汉法等^[24,25]采用固定化金属离子亲和色谱(IMAC)进行磷酸化蛋白质分析。他们用亚氨基二乙酸(IDA)修饰硅胶整体柱,然后键合上 Fe^{3+} ,通过 MALDI-TOF MS 鉴定发现固定化 Fe^{3+} -IDA 硅胶整体柱可以特异性地捕获 α -酪蛋白经胰蛋白酶消化所产生的磷酸化肽段。将固定化金属离子硅胶整体柱用于纳升级 RP-HPLC/纳升级 ESI-MS 分析标准的磷酸化肽段以及大鼠肝脏的酶解产物,其中从 12

mg 大鼠肝脏的酶解物样品中分离鉴定出 29 个单磷酸化肽,说明该系统适用于微量样品的磷酸化蛋白质组学分析。随后,他们又将 Ti^{4+} 、 Zr^{4+} 等金属离子用于 IMAC 对磷酸化肽的分析,发现由于固定化 Ti^{4+} 与聚合物填料间隔臂的灵活性以及 Ti^{4+} 与蛋白磷酸化基团的特殊相互作用,导致 Ti^{4+} -IMAC 对磷酸化肽段产生了明显的高富集效应。

邹汉法等^[26]发展了“一锅法”制备毛细管色谱手性整体柱的新方法。通过硅氧烷缩聚及其硅氧烷上的双键与单(6A-N-烯丙基胺化-6A-去氧)苯基甲酸酯化 β -环糊精原位聚合反应制备了全苯基甲酸酯化 β -环糊精($\text{Ph-}\beta\text{-CD}$) 硅胶杂化整体柱,并用于毛细管色谱手性分离中。通过“一锅法”制备的 $\text{Ph-}\beta\text{-CD}$ -硅胶杂化整体柱中 $\text{Ph-}\beta\text{-CD}$ 的结合量比柱后衍生法的高 2.9 倍。 $\text{Ph-}\beta\text{-CD}$ -硅胶杂化整体柱的通透性为 $3.63 \times 10^{-14} \text{ m}^2$,最小塔板高度为 12 μm ,对应的柱效为 83 300 塔板/m。实验中运用 $\text{Ph-}\beta\text{-CD}$ -硅胶杂化整体柱成功地拆分了 13 种外消旋化合物。由于聚合体系主要由有机溶剂(甲醇、二甲基甲酰胺)组成,因此可以突破不溶于水的有机单体在原有“一锅法”体系中不能使用的局限性。这意味着应用这个体系,可以用各种 $\beta\text{-CD}$ 衍生物以及其他疏水性单体通过“一锅法”来制备有机-硅胶杂化整体柱。

朱岩等^[27]研制了以嵌入式多壁碳纳米管为基础的的新型色谱固定相。他们采用不同的合成方法将聚苯乙烯-二乙烯基苯(PS-DVB)与碳纳米管相互混合或键合,聚合生成的 PS-DVB-碳纳米管固定相在物理和化学特性上均比 PS-DVB 固定相有一定改善。作为新型色谱固定相,碳纳米管固定相有着诸如 pH 范围更广、使用寿命更长、机械和热稳定性更长等优点。

冯钰铮等^[28]以微米硅球为核心,表面涂覆纳米二氧化钛粒子,用液相沉积法(LPD)制备了新的核壳复合物材料(SiO_2 - n LPD)。所制备的核壳复合物在分离单磷酸化肽和多磷酸化肽方面具有比商业化的二氧化钛微球更好的效率和选择性。作为 LC 固定相,这个材料的孔径更小,比表面积和孔体积更大,同时可在较极端的 pH 条件下使用。

由于 HILIC 材料对糖肽的富集选择性较为有限,因此为了提高富集效果,梁鑫森等^[29,30]采用点击化学方法将麦芽糖键合到硅胶表面,合成了名为 Click Maltose 的 HILIC 材料,并将其用于糖肽的选择性富集。对人血浆免疫球蛋白 G 糖肽的富集结果表明,Click Maltose 共富集到 27 条糖肽,而商品化材料 Sepharose CL-6B 则只富集到 13 条糖肽。在

糖基化微不均一性覆盖率的评价中,Click Maltose 材料共富集到超过 140 条人血浆 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白的糖肽,覆盖了该糖蛋白的全部 5 个糖基化位点。实验结果表明,Click Maltose 具有更好的糖肽富集选择性,可获得更好的糖肽覆盖率。

刘虎威等^[31]用 IAC 柱净化样品和富集待测组分,用液相色谱-电喷雾四极杆-飞行时间质谱(LC-ESI-Q-TOF MS)联用在线分离检测,发展了植物样品中痕量多肽激素的高灵敏度测定新方法,并将该方法用于分析实际植物样本中的系统素。实验中首先将特异性好的番茄系统素多克隆抗体固定于经溴化氰(CNBr)活化的琼脂糖凝胶固定相上,再将所制备的 IAC 柱用于富集番茄系统素、马铃薯系统素 I、马铃薯系统素 II、胡椒系统素和龙葵系统素等茄科植物的系统素。后续的 LC-ESI-Q-TOF MS 鉴定显示 IAC 柱对马铃薯系统素 I、马铃薯系统素 II 和番茄系统素有显著的富集效果。在优化条件下,该方法可以应用于鉴定番茄叶片中的番茄系统素、马铃薯叶片中的马铃薯系统素。番茄系统素、马铃薯系统素 I 和马铃薯系统素 II 的检出限分别为 29、72 和 135 pg/g,平均回收率分别为 92.9%、56.7% 和 34.8%。

钱小红等^[32]采用表面引发原子转移自由基聚合(SI-ATRP)制备了一种三维波浪状聚合物修饰的毛细管开管柱,并将其应用于磷酸肽的在线富集与质谱鉴定。经 SI-ATRP 修饰的毛细管柱内壁高度粗糙,具有超大的表面积,并且非交联的聚合物链间存在大量孔隙可供磷酸肽出入,将富集扩展至三维立体,因此大幅度地提高了磷酸肽样品的富集效率、选择性和负载量。以 α -酪蛋白为模型,使用经 SI-ATRP 修饰的毛细管柱进行磷酸肽富集,鉴定结果覆盖了 100% 的理论磷酸化位点。50 次重复实验结果表明,该富集材料性能稳定,磷酸肽鉴定结果重现性高。将该毛细管柱用于 HepG2 细胞全蛋白磷酸化的在线富集与质谱鉴定,成功地鉴定到 475 个非冗余的磷酸肽和 662 个磷酸化位点。

4.2 新型富集材料

在复杂样品的色谱分析过程中,样品前处理及净化富集是一个重要的前提。样品富集的好坏不仅直接影响分析结果,而且可能影响分析仪器的使用寿命。因此,人们不断地研发新的富集材料,改进样品前处理方法,使之更准确、有效、简单和快速。我国色谱工作者选用多种新材料制备了多种新型富集材料,为农业及环境样品分析、磷酸化肽及蛋白质组学分析等提供了新颖有效的研究手段和方法。

李攻科等^[33]用微波辅助悬浮聚合方法制备以莠

去津为模板分子的分子印迹磁性微球。采用微波加热,使得整个聚合过程所用时间只有传统加热法的 1/10,改善了印迹反应效率。将该分子印迹磁性微球应用于复杂样品中痕量组分分析体现了高的选择效应和磁性分离效果,可以将其用于富集土壤、大豆、粟米和生菜样品中的三嗪类除草剂。该分子印迹磁性微球经过 100 次的重复使用后依然有很高的稳定性。

张丽华等^[34]采用蛋白质印迹和金属螯合相结合的策略,制备了新型蛋白质印迹材料,实现了对模板蛋白质的高选择性识别。

张祥民等^[35,36]制备了多种新型富集材料。他们将磁性纳米微球固定于 C8 键合相制备成磁性硅胶,用于富集肽/蛋白质,富集倍数达 100 ~ 500 倍。将二氧化钛涂渍于磁性微球上用于富集磷酸化肽,富集倍数可达到 300 ~ 1 200 倍。将刀豆球蛋白固定于磁性微球用于富集糖蛋白,糖蛋白的纯度可达 95%。实验表明,所制备的新型富集材料可简便、快速、高效地富集芳香族化合物。

邓春晖等^[37]通过表面活性剂模板溶胶-凝胶法合成了以磁性 Fe_3O_4 为核心和以二氧化硅为壳的超顺磁性微球。得到的微球具有高磁化强度(53.3 emu/g)、高比表面积(365 m^2/g)、大孔体积(0.29 cm^3/g)和均匀的孔径(2.3 nm)。由于其独特的核壳微球的大孔径和优异的磁学性质,可以实现高效率(>95%)的微囊藻毒素的快速清除。

杨芑原等^[38]将沸石用于低丰度蛋白质和磷酸化肽的富集研究。沸石纳米晶体用于 MALDI-TOF MS 检测低丰度蛋白质的脱盐步骤,提高了 MS 检测肽段的信噪比,可以用于蛋白质组学的研究。他们^[39]还将金属离子固定化的沸石纳米粒子用于富集胰蛋白酶消化 β -酪蛋白产生的磷酸化肽段,其富集倍数达到 100 ~ 1 000 倍,检出限达到 1 ng/L。结果表明,经过改性的沸石纳米粒子可以有效地用于磷酸化肽的 MALDI-TOF MS/MS 检测。

蔡亚岐等^[40]在 Fe_3O_4 颗粒表面键合 C18 基团后再包覆壳聚糖(CTS)聚合物,制得 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{C18}/\text{CTS}$ 磁性纳米粒子。该磁性纳米粒子外层的亲水性多孔状壳聚糖聚合物不仅能该萃取剂在水溶液中更好地分散,还可通过静电斥力和体积排阻作用避免溶液中腐殖酸和其他胶体分子进入颗粒内部干扰目标物的萃取,又不影响内层 C18 基团对小分子目标物的吸附,从而提高萃取剂的抗干扰能力。对于阴离子型全氟类化合物(PFCs),壳聚糖层还能起到辅助萃取作用。利用该磁性纳米粒子与 HPLC-MS/MS

系统结合建立了磁性固相萃取-色谱/质谱分析方法,并用于环境水样中PFCs的分析。结果表明 $0.1\text{ g Fe}_3\text{O}_4/\text{C18}/\text{CTS}$ 萃取剂从 500 mL 环境水样中萃取痕量PFCs仅需 30 min ,几种环境水样中7种PF-Cs的检出限为 $0.08\sim 0.24\text{ ng/L}$,加标回收率为 $56\%\sim 112\%$ 相对标准偏差(RSDs)为 $2\%\sim 8\%$;该方法简单、可靠、快速、灵敏、抗干扰性强。

刘震等^[41]为了增强硼亲和整体柱在中性pH时的亲和富集能力,提出了“分子团队”概念和“协同共单体开环聚合”。该方法利用形成整体材料的共单体间形成的分子间硼-氮配位作用代替Wulff型苯硼酸分子中存在的分子内硼-氮配位作用,只需一步反应即可制备得到所需的整体柱,操作简单,对操作者和环境友好。制备得到的整体柱可直接用于生理样品中的核苷等生物分子的专一性富集。

张伟亚等^[42]合成了端羟基硅油高分子功能化的单壁碳纳米管(SWNTs-TOS-OH)。这种材料通过修饰不仅将具有反应活性的硅羟基引入单壁碳纳米管,使之能参加溶胶-凝胶反应,同时也改善了单壁碳纳米管在有机溶剂中的溶解性能,为溶胶-凝胶方法稳定均匀地涂渍固相微萃取(SPME)涂层创造了条件。将SWNTs-TOS-OH涂渍的SPME涂层用于对不同介质中的多溴二苯醚、多氯联苯和多环芳烃等高沸点、高毒性污染物的分析,表现出很高的萃取效率和选择性,其中对分布最广、危害最大的7种三取代到六取代的多溴二苯醚,采用顶空固相微萃取-气相色谱-电子捕获检测器(HS-SPME/GC-ECD)方法,浓缩倍数可达 $607\sim 3\,066$ 倍,检出限为 $0.08\sim 0.8\text{ ng/L}$,RSD达 $2.2\%\sim 7.5\%$,回收率为 $74\%\sim 109\%$ 。与其他纳米材料涂层或商用涂层相比,灵敏度增加了 $5\sim 29$ 倍。该涂层制备简单,重复性好,使用温度高($340\text{ }^\circ\text{C}$),使用寿命长(>200 次),能有效用于水库、污染废水等实际样品中痕量多溴二苯醚的测定。在对人造地板中16种多环芳烃和水样中多氯联苯的测定中也显示出高的富集效率和对构型的特殊选择性。

5 新型分析仪器

色谱仪器是色谱科学的基石,是建立色谱方法的前提,也是色谱分析研究的主要内容之一和理论成果的重要体现形式。许多新方法都是基于某种新型仪器的发明而发展起来的,分析仪器的发展水平也代表了色谱领域创新能力和技术发展的水平。信息科学、生命科学、材料科学的深入发展也促使色谱仪器的研发突飞猛进,新技术和新产品不断涌现。

另一方面,经济和社会发展也对分析技术和仪器提出许多新的需求,使新型色谱仪器的研究与应用进入一个高速发展期。我国色谱工作者在仪器的专用小型化、分析处理的快速自动化、接口及平台的集成系统化方面均取得了诸多创新成果。

阎超等^[43]采用同轴包层液接口将pCEC与ESI-MS相连接,用于多肽和蛋白质的分离分析,实验中对有机改性剂以及施加电压对分离的影响进行了考察,同时就有机相的pH值以及电解质浓度对ESI-MS的影响也进行了研讨。实验以多肽混合物为目标物比较了采用加压电色谱、毛细管液相色谱等不同分离方法时系统的分辨率和灵敏度,评估了实验装置和系统的可靠性与可行性。结果证明该pCEC-ESI-MS系统可以很好地分离经胰蛋白酶消化后的细胞色素c和修饰蛋白等实际样品,体现了该系统在蛋白质组学分离分析中的应用潜力。

关亚风等^[44]发展了高压电渗泵,用 10 kV 电压驱动,填充纳米氧化硅的电渗柱($20\text{ cm}\times 0.25\text{ mm}$)输出静态压强超过了 40 MPa 。关亚风等^[45]还发明了一种并联供电-串联增压的电渗泵,使用较低的驱动电压就能获得很高的输出压强。整个系统用填充毛细管和低电压模块构成,可以直接制造在芯片上,为芯片液相色谱和微型流动分析系统提供了高压输液泵。

张祥民等^[46]发展了一种新的毛细管液相色谱用热膨胀泵,其特点包括高压、稳流、二元梯度、微升至纳升级流量输出、不分流等。该泵的优点是低成本、低溶剂消耗、无磨损部件、无压力脉动等。他们研究了以水为介质时的体积热膨胀规律,获得了热膨胀规律、体积压缩规律、质量密度变化关系;在此基础上建立了完整的理论计算模型,获得了准确的温度、压力与流量输出关系。基于此模型研制的微纳流色谱泵系统在流量为 $1\text{ }\mu\text{L/min}$ 时的精度 $<2.5\%$ 。由于采用全新原理,仪器生产加工成本比传统仪器或商品微流毛细管液相色谱的成本降低数倍,具有重要的理论和应用价值。

梁鑫淼等^[47]开发了一种基于阳离子交换微球的电渗泵(EOP)高压电场去耦合器。阳离子交换微球将电极与EOP通道内的溶液直接隔离开来,因此消除了电解气对泵通道内溶液的干扰。该去耦合器易于制作,且有很低的系统电阻及很好的电流传输效率,同时可承受至少 $3\,200\text{ psi}$ 的压力。利用该去耦合器,并通过一凝胶型硅胶整体柱作为泵体的EOP构建了一完整的毛细管离子色谱(CIC)系统。该系统表现出较好的运行稳定性。采用该系统成功

地分离了 5 个无机阴离子,其中保留时间的 RSD 范围为 0.9%~1.8%。

王秋泉等^[48]设计和构建了一种独特的新型联用热扩散接口(TDI),用于 GC 和电感耦合等离子质谱(ICP-MS)对无机铅和汞的分离鉴定。使用溴化丁基镁将 Pb^{2+} 、 $(\text{CH}_3)_3\text{Pb}^+$ 、 $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{Pb}^+$ 、 Hg^{2+} 、 CH_3Hg^+ 和 $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$ 衍生化为 $\text{Pb}(\text{C}_4\text{H}_9)_4$ 、 $(\text{CH}_3)_3\text{PbC}_4\text{H}_9$ 、 $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{PbC}_4\text{H}_9$ 、 $(\text{C}_4\text{H}_9)_2\text{Hg}$ 、 $\text{CH}_3\text{HgC}_4\text{H}_9$ 和 $\text{C}_2\text{H}_5\text{HgC}_4\text{H}_9$ 。这些衍生物可以用 15 m 长的毛细管在 7 min 内分离,一次进样就可以将有机以及无机 Pb 和 Hg 分离。该方法对于 Me_4Pb 、 Et_4Pb 、 $\text{Me}_3\text{Pb}^{3+}$ 、 Pb^{2+} 、 MeHg^+ 、 EtHg^+ 和 Hg^{2+} 的检出限分别为 0.07、0.06、0.04、7.0、0.09、0.1 和 0.2 pg/g。此外,他们还合成了氯化三丙基铅,并将其作为内标物用于环境和生物样本中 Pb 和 Hg 的定性和定量。该方法可以用来分析确证参考材料中 Pb、Hg 的种类,并对生物样本中的 Pb、Hg 进行快速分析;也可以扩展用来检测其他经过适当修饰的金属有机化合物,并在揭示这些化合物在环境和生物体中的产生、代谢、毒性以及生物影响的研究中做出贡献。

陈义等^[49]建立了一种具有强散射光但背景噪声微弱的表面等离子体激子增强共振光散射检测器。在加入罗丹明 B 和 KI 进行样品提取和离子缔合萃取之后,可特异性地检测标准品以及实际样品中的 Cr^{6+} ,检出限可达到 20 nmol/L,比原子火焰吸收光谱要灵敏 40 倍,比荧光光谱灵敏 140 倍。其线性工作范围为 40~320 nmol/L,峰高的 RSD 小于 3%,回收率的范围为 94.8%~104.9%。理论上,这个方法可分析所有能产生或消耗 I_2 的物质。

阎超等^[50]设计了同轴液体鞘流接口(coaxial sheath liquid interface),实现了加压毛细管电色谱(pressurized capillary electrochromatography, pCEC)与电喷雾离子阱质谱的在线联用。在色谱柱入口端加正电,质谱喷雾端接地,离子喷雾电压为 4.5 kV,用正离子全扫描模式成功地分离分析了多种多肽和蛋白质。鞘流的引入获得了稳定的 ESI 流量, pCEC 的双重分离机制使得可以通过调节电压来提高分离选择性,缩短分离时间。系统对细胞色素 c 酶解肽段、胰岛素及其修饰物进行了 pCEC 梯度洗脱分离和质谱定性,证明所建立的加压电色谱-电喷雾质谱联用系统适合于生化样品的分离分析。

6 色谱技术与应用

康经武等^[51]将 CE 发展成为集酶活性测定和

分离检测于一体的快速筛选中药活性成分的技术。他们将要筛选的药物靶标酶用离子交换的方式固定在 CE 毛细管柱头,制成在线的固定化酶微反应器,用于抑制剂研究和筛选。过程如下:底物溶液进样后在微反应器中孵育很短时间后,施加分离电压将产物和未发生反应的底物分离,所测定的产物峰面积反映了酶的活性。如果在底物溶液中加入的待筛选化合物抑制了固定化酶的活性,CE 谱图中产物的峰面积就会下降。酶微反应器的制备分为两步:首先,用聚阳离子电解质溴化己二甲胺溶液冲洗毛细管柱;然后,注入酶溶液孵育 5 min 使酶分子通过离子交换的方式固定化于带正离子的涂层。实验中选择血管紧张素转换酶(ACE)作为固定化酶验证方法的可行性和实用性。通过离子交换的方式,固定化的 ACE 仍保持高活性和稳定性,并能重复使用。由于毛细管的进样体积只有 9.8 nL,且酶能重复使用,因此筛选成本大大降低。由于 CE 使用开管柱并且无固定相,因此不受中药中复杂成分的污染。同时,CE 的分离过程也能消除样品基质对测定的干扰。实验结果表明,该方法可用于中药活性成分的筛选,具有简单、快速、可靠且自动化的特点。

石墨烯作为一种新的碳纳米材料,拥有很高的比表面积,作为吸附材料有着巨大的使用潜力。江桂斌等^[52]将石墨烯作为一种新型吸附剂用于 SPE。实验中用石墨烯 SPE 柱分离了 8 个氯酚化合物(CPs),然后用碱性甲醇洗脱。使用多波长紫外检测 HPLC 法测定洗脱液中 CPs 的含量。在优化条件下,该方法的检出限范围为 0.1~0.4 $\mu\text{g/L}$,CPs 检测的 RSDs 范围为 2.2%~7.7%,灵敏度高、重现性好。比较研究表明,石墨烯对 CPs 的富集提取效率优于 C18 硅胶、石墨碳、单壁和多壁碳纳米管等其他吸附剂材料。石墨烯作为 SPE 吸附剂还具备其他一些特点,如与各种有机溶剂较好的兼容性、良好的重复性和不受干燥剂影响等。该方法已成功地应用于自来水和河水样本的分析,其回收率范围为 77.2%~116.6%。这项工作不仅提出了一种新的环境水样预处理方法,同时也证明作为新型吸附剂材料的石墨烯在分析过程中具有很大的应用潜力。

7 结语

有关中国色谱研究工作的文章仅 2011 年就有 SCI 论文 4 500 多篇。本综述只是从有限的方面列举了少量典型的研究工作,大量的高水平研究没有能在此介绍,难免以偏概全。尽管如此,我们仍能看出中国色谱研究已取得了世人瞩目的成就,实现了跨越式

的发展,研究水平和国际地位得到巨大提升,特别是在国际学术期刊(以SCI期刊为代表)发表论文数量上,继2010年首次超过美国、日本、德国等国家之后,2011年稳居第一位。从已发表的研究论文的特点分析,中国在色谱新原理、新理论、色谱关键技术与仪器等原始创新性的工作所占比例尚不高,高水平期刊发表文章数量和论文的平均引用率等与传统色谱强国仍有明显差距。然而令人欣喜的是,中国色谱领域的高水平研究成果越来越多,论文质量与数量同时快速增长,在原创性的研究方面已展示出相当大的潜力,特别是在色谱分离新技术和新方法、蛋白质组多维分离技术、代谢组学分析等已出现许多国际领先成果,显示了明显的优势和创新潜力。随着国家在基础研究、应用研究,尤其是科学仪器重大专项的巨大投入,相信更多的原始创新性的新理论、新原理、新方法、新技术和新仪器将出现在中国。

参考文献:

- [1] Goss K U, Schwarzenbach R P. *Environ Sci Technol*, 2001, 35: 1
- [2] Guo R B, Liang X M, Chen J P, et al. *Anal Chem*, 2002, 74: 655
- [3] Hao W Q, Zhang X M, Hu F L. *Anal Chem*, 2007, 79: 2507
- [4] Liu P, Yang H Y, Geng X D. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 7497
- [5] Ke C Y, Li J J, Liu Z L, et al. *Int J Mol Sci*, 2009, 10: 616
- [6] Qiu H, Takafuji M, Liu X, et al. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 5190
- [7] Yao C H, Qi L, Qiao J, et al. *Talanta*, 2010, 82: 1332
- [8] Gu X, Deng C H, Yan G Q, et al. *J Proteome Res*, 2006, 5: 3186
- [9] Zhang J, Xu X Q, Gao M X, et al. *Proteomics*, 2007, 7: 500
- [10] Song C X, Ye M L, Han G H, et al. *Anal Chem*, 2010, 82: 53
- [11] Ma J F, Hou C Y, Sun L L, et al. *Anal Chem*, 2010, 82: 9622
- [12] Qu Y Y, Xia S M, Yuan H M, et al. *Anal Chem*, 2011, 83: 7457
- [13] Wei J, Gu X, Wang Y, et al. *Electrophoresis*, 2011, 32(2): 230
- [14] Wang Y, Wang J, Yao M, et al. *Anal Chem*, 2008, 80: 4680
- [15] Wang Y, Lu X, Xu G. *J Chromatogr A*, 2008, 1181: 51
- [16] Huo T G, Cai S, Lu X M, et al. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49: 976
- [17] Zhang T, Fang Q, Du W B, et al. *Anal Chem*, 2009, 81: 3693
- [18] Sun M, Fang Q. *Lab Chip*, 2010, 10: 2864
- [19] Du W B, Sun M, Gu S Q, et al. *Anal Chem*, 2010, 82: 9941
- [20] Liu Z, Ou J J, Samy R, et al. *Lab Chip*, 2008, 8: 1738
- [21] Ou J J, Glawdel T, Samy R, et al. *Anal Chem*, 2008, 80: 7401
- [22] Gao D, Wei H B, Guo G S, et al. *Anal Chem*, 2010, 82: 5679
- [23] Sun X J, Zhu Y L, Wang P, et al. *J Chromatogr A*, 2011, 1218: 833
- [24] Feng S, Pan C S, Jiang X G, et al. *Proteomics*, 2007, 7: 351
- [25] Zhou H J, Ye M L, Dong J, et al. *J Proteome Res*, 2008, 7: 3957
- [26] Zhang Z B, Wu M H, Wu R A, et al. *Anal Chem*, 2011, 83: 3616
- [27] Zhong Y Y, Zhou W F, Zhang P M, et al. *Talanta*, 2010, 82: 1439
- [28] Wu J H, Li X S, Zhao Y, et al. *J Chromatogr A*, 2011, 1218: 2944
- [29] Yu L, Li X L, Guo Z M, et al. *Chem Eur J*, 2009, 15: 12618
- [30] Guo Z M, Lei A W, Zhang Y P, et al. *Chem Commun*, 2007, 43: 2491
- [31] Du F Y, Bai Y, Bai Y, et al. *Anal Chem*, 2010, 82: 9374
- [32] Qin W J, Zhang W J, Song L N, et al. *Anal Chem*, 2010, 82: 9461
- [33] Zhang Y, Liu R J, Hu Y L, et al. *Anal Chem*, 2009, 81: 967
- [34] Liu J X, Yang K G, Deng Q L, et al. *Chem Commun*, 2011, 47: 3969
- [35] Xu X Q, Deng C H, Gao M X, et al. *Adv Mater*, 2006, 18: 3289
- [36] Deng Y H, Deng C H, Yang D, et al. *Chem Commun*, 2005, 41: 5548
- [37] Deng Y H, Qi D W, Deng C H, et al. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 28
- [38] Zhang Y H, Wang X Y, Shan W, et al. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 615
- [39] Zhang Y H, Yu X J, Wang X Y, et al. *Chem Commun*, 2004, 40: 2882
- [40] Zhang X L, Niu H Y, Pan Y Y, et al. *Anal Chem*, 2010, 82: 2363
- [41] Ren L B, Liu Z, Liu Y C, et al. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 6704
- [42] Zhang W Y, Sun Y, Wu C Y, et al. *Anal Chem*, 2009, 81: 2912
- [43] Liang Z, Duan J C, Zhang L H, et al. *Anal Chem*, 2004, 76: 6935
- [44] Chen L X, Ma J P, Tan F, et al. *Sensor Actuat B-Chem*, 2003, 88: 260
- [45] Chen L X, Wang H L, Ma J P, et al. *Sensor Actuat B-Chem*, 2005, 104: 117
- [46] Tao Q, Wu Q, Zhang X M. *Anal Chem*, 2010, 82: 842
- [47] Yang B C, Zhang F F, Liang X M, et al. *Anal Chem*, 2009, 81: 5102
- [48] Yan D, Yang L M, Wang Q Q. *Anal Chem*, 2008, 80: 6104
- [49] Han Z Q, Qi L, Shen G Y, et al. *Anal Chem*, 2007, 79: 5862
- [50] Liang Z, Duan J C, Zhang L H, et al. *Anal Chem*, 2004, 76: 6935
- [51] Tang Z M, Kang J W. *Anal Chem*, 2006, 78: 2514
- [52] Liu Q, Shi J B, Zeng L X, et al. *J Chromatogr A*, 2011, 1218: 197